

**Proteinchemische Untersuchungen an ribosomalen Proteinen
von Escherichia coli-Mutanten
mit verändertem Verhalten gegenüber Streptomycin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute van Acken

1974

**Proteinchemische Untersuchungen an ribosomalen Proteinen
von Escherichia coli-Mutanten
mit verändertem Verhalten gegenüber Streptomycin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute van Acken



1. Referent: Prof. Dr. H. G. Wittmann

2. Referent: Prof. Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1974

Inhalt

	<u>Seite</u>
<u>Einleitung</u>	1 - 7
<u>Material und Methoden</u>	8 - 16
<u>Ergebnisse</u>	
A: Aminosäureveränderungen im Protein S12 der Mutanten	
a) Escherichia coli L1-401	17 - 20
b) Escherichia coli T776/40:4 und Escherichia coli T776/39:3	20 - 22
c) Escherichia coli T779/25:3	22 - 25
B: Aminosäureveränderungen im Protein S4 der Mutanten	
a) Escherichia coli T776/40:4	25 - 34
b) Escherichia coli T779/25:3	34 - 36
c) Escherichia coli T776/39:3	36 - 40
<u>Diskussion</u>	
A: Aminosäureveränderungen am Protein S12	41 - 45
B: Aminosäureveränderungen am Protein S4	45 - 48
C: Bindung des Proteins S4 an 16S-rRNA	48
D: Die Bedeutung der Mutationen für die Funktion der Ribosomen	48 - 50
<u>Zusammenfassung</u>	51 - 52
<u>Literatur</u>	53 - 60
<u>Abkürzungen</u>	61



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543105_0046

Einleitung

Das Antibiotikum Streptomycin bewirkt den "falschen" Einbau von Aminosäuren während der Proteinbiosynthese an *Escherichia coli*-Ribosomen (Lesefehler, "misreading"). Diese durch Streptomycin induzierte sogenannte Ambiguität beim Translationsvorgang tritt zusätzlich zu einer geringen, durch Lesefehler verursachten natürlichen Ambiguität auf (Gorini 1967, 1971). In einem Poly-U-System führt Streptomycin z. B. zu dem Einbau von Leucin, Isoleucin, Tyrosin oder Serin anstelle von Phenylalanin (Davies et al. 1965, 1966, Ozaki et al. 1969).

Es gibt zahlreiche *Escherichia coli*-Mutanten, die resistent gegen Streptomycin sind. Die Ursache für ein verändertes Verhalten dieser Mutanten gegenüber Streptomycin wird sichtbar bei Stämmen, für die der Fehleinbau von Aminosäuren ein wachstumsfördernder Faktor ist, so bei L1, einer Arginindefekten Mutante von *Escherichia coli* B (Rosset & Gorini 1969). Im Strukturgen für Ornithintranscarbamylase, einem Enzym des Argininsyntheseweges, hat L1 eine amber-Mutation (Gorini et al. 1969). L1 hat jedoch keine amber-Suppressor-tRNA. Diese amber Arg F40-Mutante L1 kann auch bei Abwesenheit von Arginin noch schwach wachsen; sie ist Arginin-"leaky". Das ist möglich, weil das amber-Codon infolge von natürlichem "misreading" manchmal übersetzt wird und weil deshalb etwas Ornithintranscarbamylase synthetisiert werden kann (genetische Suppression).

L1 ist ein Streptomycin-sensibler Stamm, weil es das str A⁺-

Allel (Wildtypallel) trägt. Mutationen im str A-Gen von L1 führen zwar zu Streptomycin-Resistenz, aber auch dazu, daß diese Mutanten nicht ohne Argininzufuhr wachsen können. Genetische Suppression wie beim Ausgangsstamm L1 findet bei ihnen nicht mehr statt, d. h. Fehleinbau von Aminosäuren kommt praktisch nicht vor. So kann auch das amber-Codon in der mRNA für Ornithintranscarbamylase nicht mehr übersetzt und kein Arginin mehr synthetisiert werden.

Da das Antibiotikum Streptomycin den falschen Einbau von Aminosäuren bewirkt, fördert es die unspezifische Suppression des Terminator-Codons; d. h. bei Zugabe von Streptomycin zum Wachstumsmedium für Streptomycin-resistente Mutanten wird auch bei diesen das amber-Codon manchmal übersetzt und etwas Arginin synthetisiert (Gorini & Kataja 1964, Gorini 1967, Rosset & Gorini 1969). Ferner stimuliert Streptomycin auch die Wirksamkeit spezifischer tRNA-Suppressoren für "missense"- bzw. "nonsense"-Mutationen in Streptomycin-resistenten Mutanten, die in diesen ebenfalls vermindert ist (Strigini & Gorini 1970, Biswas & Gorini 1972, Strigini & Brickmann 1973).

Bei den Streptomycin-resistenten Mutanten wurden die vier Alleltypen str A1, str A2, str A40, str A60 gefunden. Die Wirksamkeit von Nonsense-Suppression bzw. die Fähigkeit zur Arginin-Synthese ist in der Reihenfolge str A60 < str A40 < str A2 < str A1 vermindert (Breckenridge & Gorini 1970). Das Antibiotikum Streptomycin stimuliert die Wirksamkeit der Suppression in str A-Mutanten je nach Alleltyp unterschiedstark.

Neben den schon beschriebenen Streptomycin-resistenten Mutanten gibt es auch Mutanten, die nur bei Zugabe von Streptomycin wachsen können. Bei diesen Streptomycin-abhängigen Mutanten betrifft die Störung nicht nur die genetische Suppression durch Fehleinbau von Aminosäuren und die Suppressorfunktion bestimmter tRNAs, sondern die Translation insgesamt. Diese Streptomycin-abhängigen Mutanten konnten in drei Klassen eingeteilt werden (Gorini et al. 1967, Momose & Gorini 1971):

1. Mutanten mit dem Phänotyp $Sm^D Et^D Pm^D$ (Drug-dependent), wachsen nur in Gegenwart von Streptomycin, Paromomycin oder Äthanol; sie sind aber empfindlich gegen die Zugabe von Streptomycin plus Paromomycin ($Sm+Pm$)^S.
2. Mutanten mit dem Phänotyp $Sm^D Et^D (Sm+Pm)^S$ wachsen nur mit Streptomycin oder Äthanol, nicht aber mit Paromomycin, auch nicht in Gegenwart von Streptomycin oder Äthanol.
3. Mutanten mit dem Phänotyp $Sm^D (Sm+Pm)^S$, wachsen nicht mit Paromomycin oder Äthanol. Diese Mutanten sind strikt Streptomycin-abhängig.

Sowohl von Sm^R - als auch von $Drug^D$ -Mutanten gibt es "Revertanten". Dabei handelt es sich nicht um echte Rückmutationen, sondern um Suppressormutationen. Eine zweite Mutation, die in der Nähe des str A-Locus liegt (Hashimoto 1960), wirkt phänotypisch ähnlich auf eine vorangegangene str A-Mutation wie die Zugabe von Streptomycin. Diese neue Suppressor-Mutation führt in phänotypisch Arginin-negativen Arg F40 str A1-Mutanten zu Arginin-"leakiness";

d. h. das amber-Codon wird wieder übersetzt und Arginin synthetisiert wie beim Ausgangsstamm L1. Die neue Mutation muß also zu Fehleinbau von Aminosäuren führen. Sie verstärkt die Ambiguität bei der Translation und wurde deshalb *ram*, ribosomal ambiguity mutation, genannt (Rosset & Gorini 1969). In Drug^D -Mutanten führt die *ram*-Mutation zu Drogenunabhängigkeit. Mutationen im *ram*-Locus wirken als ribosomale Suppressoren. Sie heben die durch Mutationen im *str*-Locus entstandene Verringerung einer Suppressorwirkung wieder auf. Sie sind additiv zur Wirkung von Streptomycin (Gorini 1969, Bjare & Gorini 1971).

Bei den drei beschriebenen Klassen von Streptomycin-abhängigen Mutanten wirkt sich die *ram*-Mutation verschieden aus. Revertanten der Drug^D -Mutanten sind zu 5% Sm^RPm^R und zu 95% Sm^R . Bei der Gruppe $\text{Sm}^{DE}D$ wurden nur Sm^R -Revertanten isoliert. Bei der Gruppe der strikt Sm^D -Mutanten konnten bisher keine Revertanten isoliert werden. Auch nach Einkreuzen des *ram1*-Allels durch Transduktion wird die Streptomycinabhängigkeit bei dieser Gruppe nicht aufgehoben (Bjare & Gorini 1971).

Da die beschriebenen Streptomycin-Mutanten veränderte Ribosomen enthalten, bot sich die Möglichkeit, die Ribosomen zu untersuchen. Auf diese Weise konnten Erbveränderungen genau lokalisiert werden. Die Ribosomen von *Escherichia coli*, an denen die Proteinbiosynthese abläuft, sind 70S-Partikel, die aus einer 50S- und einer 30S-Untereinheit bestehen. In vitro zerfallen die 70S-Partikel bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen in ihre Untereinheiten.

Die 30S-Untereinheit besteht aus 16S-rRNA und 21 ribosomalen Proteinen, die 50S-Untereinheit aus 23S-rRNA, 5S-rRNA und 34 ribosomalen Proteinen. Die Proteine wurden alle isoliert und ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften untersucht (Kaltschmidt et al. 1967, Traut et al. 1967, Moore et al. 1968, Craven et al. 1969, Hardy et al. 1969, Traut et al. 1969, Dzionara et al. 1970, Kaltschmidt et al. 1970, Kaltschmidt & Wittmann 1970b, Hindennach et al. 1971 a,b, Mora et al. 1971).

Um festzustellen, welche der beiden Untereinheiten bei Mutationen im str A-Locus die Veränderung bewirkt, wurden die Untereinheiten von Streptomycin-resistenten und Streptomycinsensiblen Stämmen in einem in-vitro-System ausgetauscht. Es zeigte sich, daß die Veränderung in der 30S-Untereinheit liegt (Cox et al. 1964, Davies 1964). Rekonstitution mit den einzelnen Proteinen der 30S-Untereinheit erwies, daß sowohl bei Streptomycin-resistenten als auch bei Streptomycin-abhängigen Mutanten das Protein S12 verändert ist (Ozaki et al. 1969, Birge & Kurland 1969).

Auch die oben beschriebene Suppressormutation führt zu einer Veränderung in der 30S-Untereinheit des Ribosoms (Apirion et al. 1969). Mit Phosphorzellulose-Chromatographie konnte ein verändertes Elutionsverhalten des Proteins S4 nachgewiesen werden (Kreider & Brownstein 1971, Zimmermann et al. 1971). Rekonstitution mit einzelnen Proteinen der 30S-Untereinheit ergab ebenfalls, daß die Suppressormutation im Protein S4 liegt (Birge & Kurland 1970). Außerdem wurde bei vielen dieser Suppressormutan-

ten die Lage der ribosomalen Proteine durch Auftrennung mit zweidimensionaler Gel-Elektrophorese bestimmt. Bei etwa 25% der Mutanten war die Position des ribosomalen Proteins S4 signifikant verändert (Deusser et al. 1970, Hasenbank et al. 1973).

Der nächste Schritt auf dem Wege zur Lokalisierung der Mutationen, die zur Veränderung der Proteine S4 und S12 führen, war die Untersuchung der Primärstruktur dieser Proteine. Die Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des Proteins S12 ist inzwischen bekannt; an der Sequenzierung des aus ca. 120 Aminosäuren bestehenden Proteins wird noch gearbeitet (Funatsu, unpubl. Ergebnisse). Auch bei den vier Alleltypen der Streptomycin-resistenten Mutanten wurden die Aminosäureaustausche im Protein S12 untersucht. Veränderungen fanden sich nur an zwei Positionen, nämlich 42 und 87; hier ist jeweils Lysin gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht. Bei einer Streptomycin-abhängigen Mutante wurde ebenfalls eine Veränderung von Lysin in Position 42 gefunden (Funatsu & Wittmann 1972, Funatsu et al. 1972a).

Das ribosomale Protein S4 besteht aus 203 Aminosäuren. Die Zusammensetzung der tryptischen Peptide (Wittmann-Liebold 1971) und die Sequenz der Aminosäure (Reinbolt & Schiltz 1973) sind bekannt. Bei einigen Revertanten von Streptomycin-Abhängigkeit zu Streptomycin-Unabhängigkeit wurden Verkürzungen um 20 bis 30 Aminosäuren am C-Terminus von S4 festgestellt (Funatsu et al. 1972b). Der molekulare Mechanismus der Kettenverkürzung wurde bisher an einer

S4-Mutante aufgeklärt (E. Schiltz, unveröffentlichte Resultate).

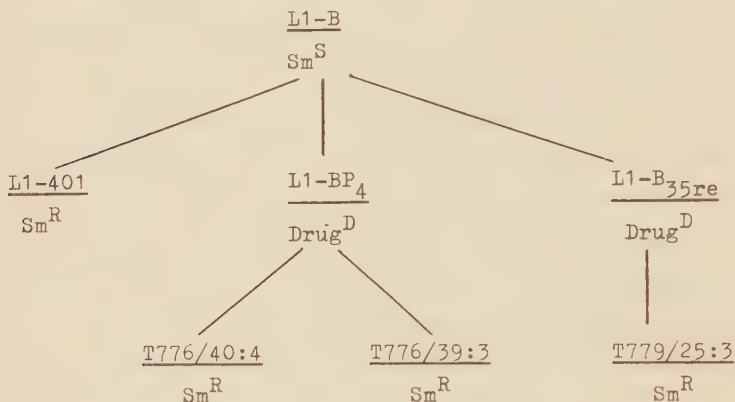
In dieser Arbeit wurden das ribosomale Protein S12 einer Sm^R -Mutante sowie die ribosomalen Proteine S12 und S4 dreier ram-Mutanten untersucht. Die ram-Mutanten sind Revertanten von zwei verschiedenen $Drug^D$ -Mutanten. Mit proteinchemischen Methoden sollte festgestellt werden, ob die Sm^R -Mutation und die $Drug^D$ -Mutationen im Protein S12 in der Nähe der von den Streptomycin-resistenten Mutanten schon bekannten Positionen 42 und 87 liegen. Ferner sollten die proteinchemischen Veränderungen im Protein S4 bei den drei ram-Mutanten lokalisiert werden, und es war interessant zu untersuchen, ob diese Veränderungen im S4 bei allen ram-Mutanten verschieden oder gleich sind.

Die Kenntnis der Veränderungen in der Primärstruktur der betreffenden Mutanten-Proteine ist eine Voraussetzung für ein weitergehendes Verständnis des molekularen Wirkungsmechanismus, auf dem das veränderte Verhalten der Mutanten gegenüber Streptomycin beruht.

Material und Methoden

Bakterienstämme

Alle hier untersuchten Mutanten stammen ab von *Escherichia coli* L1-B. Sie wurden freundlicherweise von Dr. L. Gorini, Boston, zur Verfügung gestellt.



E. coli L1-B: Arginin-defekte Mutante von *Escherichia coli* B. L1-B hat das Arg F40-Allel im Strukturgen für Ornithintranscarbamylase (Gorini et al. 1961), das Arg R11-konstitutive Allel im Regulatorgen für die Argininsynthese (Jacoby & Gorini 1969) und die Aro E24-Mutation (Pittard & Wallace 1966). Genotyp: str A⁺ram⁺su⁻, phänotypisch Arginin-leaky und Streptomycin-sensibel.

Mutanten von *E. coli* L1-B:

E. coli L1-401: Streptomycin-resistente Mutante von L1-B, Genotyp: str A1 ram⁺, phänotypisch Arg⁻.

E. coli L1-B_{35re}: Drug^D-Mutante von L1-B, isoliert nach Zugabe von 500 µg Streptomycin/ml Wachstumsmedium, phänotypisch Arg^{CSD}, Genotyp: str Ad ram⁺.

E. coli L1-BP₄: Drug^D-Mutante von L1-B, isoliert nach Zugabe von 200 µg Paromomycin/ml Wachstumsmedium, phänotypisch Arg^{CDS}, Genotyp: str Ad ram⁺.

E. coli T779/25:3: Sm^R-Revertante von L1-B_{35re}, phänotypisch Arg^{CSD}, Genotyp: str Ad ram.

E. coli T776/40:4: Sm^R-Revertante von L1-BP₄, phänotypisch Arg^{CSD}, Genotyp: str Ad ram.

E. coli T776/39:3: Sm^R-Revertante von L1-BP₄, phänotypisch Arg CSD, Genotyp: str Ad ram.

Präparation der Ribosomen

Bei starker Belüftung wurden die Zellen in reichem Medium (Hefeextrakt, Peptone, Glukose) in einem Fermenter vermehrt, in der mittleren bis späten log-Phase geerntet und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Zur Isolierung der Ribosomen wurden die Zellen in Portionen von je 500 g in 1750 ml Tris-Puffer gegeben (0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 M Magnesiumacetat) und im Eisbad unter Zugabe von 1 mg Desoxyribonuclease/100 g Bakterien eine Stunde lang gerührt. Nach zehn Minuten Zentrifugation bei 10 000 rpm im Sorvall GSA Rotor wurden die Zellen portionsweise aufgearbeitet. Je 125 g Bakterien wurden mit 250 g Alcoa A-305-Pulver unter allmählicher Zugabe von 150 ml Tris-Puffer (0,01 M Tris-HCl, pH 7,8,

0,01 M MgCl_2 , $6 \cdot 10^{-3}$ M Mercaptoäthanol) in einer automatischen Mühle aufgebrochen. Mahlzeit 40 Minuten bei 4°C . Nach zweimaliger, 30 Minuten langer Zentrifugation bei 16 000 rpm bei 4°C in einem Sorvall SS34 Rotor wurde der Überstand bei 55 000 rpm in einem 60 Ti Rotor drei Stunden lang zentrifugiert. Dann wurde das 70S-Ribosomensediment über Nacht gegen 0,01 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4, 0,001 M MgCl_2 , 0,01 Mercaptoäthanol dialysiert, so daß die 70S-Ribosomen in ihre 30S- und 50S-Untereinheiten dissoziieren konnten. Die Trennung der Untereinheiten erfolgte in einem 7,5%igen bis 38%igen Sucrose-Gradienten im Dialysepuffer durch 17 Stunden lange Zentrifugation bei 25 000 rpm in einem Spinco B 60 Ti Zonalrotor. Gemessen wurde die optische Dichte bei 295 nm. In einem Zonallauf konnten bis zu 1,7 g Ribosomen getrennt werden. Die gesammelten 30S-Untereinheiten wurden 48 Stunden lang gegen destilliertes Wasser dialysiert. Nach Zugabe von 11 ml 1M Kaliumchlorid und 0,1 M Magnesiumchlorid zu 100 ml 30S-Lösung wurde über Nacht bei -18°C in Äthanol gefällt und anschließend 15 Minuten lang bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das Sediment der 30S-Untereinheiten wurde in Dissoziationspuffer aufgenommen.

Neuerdings wurde eine etwas vereinfachte Methode zur Isolierung von Ribosomen benutzt. Vierzig Gramm Zellen werden mit 80 g Alcoa mit der Hand in einem Mörser zerrieben, 80 ml Dialysepuffer und 0,8 mg Desoxyribonucleinsäure zugegeben und bei 16 000 rpm 30 Minuten lang im Sorvall SS34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird sofort auf den Sucrose-Gradienten gegeben.

Extraktion der ribosomalen Proteine

Zu 400 ml 30S-Untereinheiten wurden 100 ml 1 M Magnesiumacetat und in zwei Portionen 1100 ml konzentrierte Essigsäure gegeben. Eine halbe Stunde lang wurde auf Eis gerührt, dann 30 Minuten lang bei 16 000 rpm zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde noch einmal mit 60%iger Essigsäure gewaschen und beide Überstände am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Proteinlösung wurde über Nacht gegen 2%ige Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

Die Ausbeute an 30S-Protein betrug 1 bis 1,8 g. Hierzu war die Aufarbeitung von 1 bis 1,5 kg Zellen mit je 16 bis 20 Zonalläufen nötig.

Trennung der 30S-Proteine

Die Auftrennung der 30S-Proteine erfolgte mit Carboxymethylcellulose (CM 32 von Whatman). Die Säule (3 cm x 120 cm) wurde unter Druck ($0,1 - 0,3 \text{ kp/cm}^2$) gepackt und mit 0,01 M Pyridin-Ameisensäure-Puffer (0,8 ml Pyridin, 4,8 ml Ameisensäure, 1 ml Mercaptoäthanol pro Liter, 6 M Harnstoff, pH 3,3) äquilibriert. Die Probe, 1-2 g Protein, wurde gegen diesen Puffer dialysiert und mit der Pumpe in einer Geschwindigkeit von 30 ml/h aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0,01 M bis 0,6 M Pyridin-Ameisensäure (48 ml Pyridin, 19,2 ml Ameisensäure, 1 ml Mercaptoäthanol pro Liter, 6 M Harnstoff, pH 4,4) eluiert. Elutionsgeschwindigkeit 50 ml/h, Fraktionsgröße 14 ml.

Von jeder 5. Fraktion wurde 0,7 - 1 ml abgenommen, gegen

Wasser und 0,01 Mercaptoäthanol dialysiert, am Rotationsverdampfer getrocknet und mit Disc-Elektrophorese in 15%igem Acrylamid, pH 4,5, 6 M Harnstoff auf Protein getestet. Fraktionen, die das gesuchte Protein zusammen mit anderen Proteinen enthielten, wurden auf Sephadex G100 nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt (Elutionsmittel 15%ige Essigsäure, 220 cm x 2 cm Säule). Die Reinheit der Proteine wurde mit der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese getestet (nach Kaltschmidt & Wittmann 1970a). Die isolierten Proteine wurden auf Biogel P10 mit 15%iger Essigsäure entsalzt, konzentriert und lyophilisiert.

SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese

Zum Vergleich der Molekulargewichte von Wildtyp-S4-Protein und Mutanten-S4-Protein wurde die SDS-Gel-Elektrophorese nach Weber & Osborn (1969) in 10%igem Acrylamid durchgeführt. Das Protein wurde zwei Stunden lang bei 37°C in 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7, 1% Sodiumdodecylsulfat, 1% Mercaptoäthanol inkubiert. Kammerpuffer 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,8, 0,1% SDS. Es wurden 11 und 16 cm lange Gelröhrchen verwendet, je 10 µl Protein + 3 µl Bromphenolblau aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Coomassie brilliant blue gefärbt.

Spaltung der Proteine mit Bromcyan

Zur Spaltung der Proteine am Carboxylende des Methionins wurden diese mit Bromcyan behandelt. 0,5 mg Protein wurden in 70%iger Ameisensäure gelöst, 0,5 mg Bromcyan hinzugefügt

und 20 Stunden lang bei Zimmertemperatur gespalten. Die lyophilisierten Peptide wurden mit der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

Spaltung am C-Terminus der Proteine mit Carboxypeptidasen

Die Abspaltung von Aminosäuren am C-Terminus wurde mit Carboxypeptidase A und Carboxypeptidase B bei 37°C, einem Enzym: Substrat-Verhältnis von 1:50 in 0,05 M N-Methylmorpholin-Essigsäure, pH 8, durchgeführt. Für eine Analyse auf dem Aminosäureanalysator bei einem Empfindlichkeitsbereich von 1 - 5 nMol wurden ca. 200 µg Protein benötigt. Die Spaltung wurde von 5 Minuten bis zu 3 Stunden durchgeführt.

Spaltung der Proteine mit Trypsin

Die tryptische Spaltung der Proteine erfolgte in 0,05 M N-Methylmorpholin-Essigsäure bei pH 8. Je nachdem, ob die Trennung der tryptischen Peptide mit der Fingerprint-Technik oder durch SE-Cellulose erfolgen sollte, wurden 0,5 mg bis 30 mg Protein in dem Puffer gelöst und 4 Stunden lang bei pH 8 und 37°C mit Trypsin gespalten. Enzym: Substratverhältnis 1:50. Die erste Hälfte des Enzyms wurde sofort, die zweite eineinhalb Stunden nach Beginn der Spaltung zugegeben. Das Peptidgemisch wurde tiefgefroren und ein- bis zweimal lyophilisiert.

Trennung der tryptischen Peptide mit der Fingerprint-Technik

0,5 mg bis 1,5 mg des Peptidgemisches wurde in 10-20 µl 30%iger Ameisensäure gelöst, punktförmig auf das mit Puffer

angefeuchtete Elektrophoresepapier aufgetragen und in der ersten Dimension durch Hochspannungselektrophorese aufgetrennt. Elektrophoresepapier: Schleicher & Schüll, Nr. 2043b, oder Whatman 3MM. Elektrophoresepuffer: Essigsäure, Pyridin, Aceton, Wasser im Verhältnis 40:20:150:790, pH 4,4. Laufzeit 3 Stunden bei 3000 V oder 4 Stunden bei 2500 V. In der zweiten Dimension wurden die Peptide papierchromatographisch aufgetrennt, Lösungsmittel: Pyridin, Butanol, Essigsäure, Wasser im Verhältnis 50:75:15:60 (PBEW). Anfärben der Peptide auf dem Chromatogramm erfolgte durch leichtes Besprühen mit Ninhydrin (3 g Ninhydrin, 30 ml Collidin, 100 ml Essigsäure, 870 ml Äthanol). Das Zentrum der Flecken wurde jeweils ausgeschnitten, das Ninhydrin mit Aceton entfernt, anschließend 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit 50%iger Essigsäure eluiert, das Eluat im Rotationsverdampfer getrocknet und hydrolisiert. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Peptide wurde mit dem Aminosäureanalysator bei einer Empfindlichkeit von 1 - 5 nMol durchgeführt.

Die Fingerprint-Methode hat den Vorteil, daß relativ geringe Mengen Protein eingesetzt werden können. 0,5 mg bis 1,5 mg Protein reichen aus für eine Analyse je eines Peptids. Der Nachteil dieser Methode ist, daß die isolierten Peptidmengen für eine Sequenzanalyse auf dem Peptidsequenator nicht ausreichen und daß eine Aminosäureveränderung gegenüber dem Wildtypprotein schwer feststellbar ist, wenn das entsprechende tryptische Peptid des Wildtyps oder der Mutante sich mit anderen tryptischen Peptiden überlappt.

Trennung der tryptischen Peptide durch Sulfoäthylcellulose und Papierchromatographie

Die Trennung der Peptide erfolgte auf SE-Cellulose durch einen Varigrad mit 8 Kammern. Der Varigrad enthielt folgende Pyridin-Ameisensäure-Puffer, je Kammer 150 ml: 0,01 M, pH 2,6; 0,02 M, pH 2,8; 0,03 M, pH 3,0; 0,04 M, pH 3,1; 0,06 M, pH 3,3; 0,08 M, pH 3,5; 0,10 M, pH 4,1; 0,32 M, pH 4,5.

Bei dem ribosomalen Protein S12 wurde mit diesem Varigrad eine ausreichend gute Trennung erzielt. Beim ribosomalen Protein S4 mußten zwei weitere Puffer eingeschoben werden: 0,015 M Pyridin, pH 2,7, und 0,025 M Pyridin, pH 2,9. 15 mg bis 30 mg des Peptidgemisches wurden in ca. 1 ml des ersten Puffers aufgenommen, bei 10 000 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert und auf die SE-Cellulosesäule (45 cm x 1,5 cm) aufgetragen. Unge- löstes Material war in konzentrierter Ameisensäure löslich. Zunächst wurden 20 Fraktionen mit dem ersten Puffer eluiert, danach wurde der Gradient angeschlossen. Durchflußgeschwindigkeit 30 ml/Stunde, Fraktionsgröße 4 ml. Im Anschluß an den Gradienten wurde noch 24 Stunden lang mit 30%igem Pyridin/ 50%iger Ameisensäure eluiert.

Eine Übersicht über die Peptide wurde zunächst gewonnen, indem ein Aliquot jeder vierten Fraktion (0,6 ml bei Einsatz von 20 - 30 mg Protein) abgenommen, im Rotationsverdampfer getrocknet, in zwei Tropfen 30%iger Ameisensäure gelöst und auf je 0,5 cm des Chromatogrammpapiers aufgetragen wurde. Laufmittel: n-Butanol, Pyridin, Essigsäure, Wasser im Verhältnis 75:50:15:60. Die Chromatogramme wurden zum Nachweis der Peptide

sehr stark mit Ninhydrin besprüht. Anhand dieser Übersicht wurden die Fraktionen zusammengegeben und die Peptide in gleicher Weise wie bei der Übersicht, nur in präparativen Mengen, aufgetrennt. Nach Elution mit 50%iger Essigsäure, Trocknen und Hydrolyse der Peptide erfolgte deren Aminosäurenbestimmung auf dem Aminosäureanalysator.

Hydrolyse

Je ein Aliquot der eluierten, im Rotationsverdampfer getrockneten Peptide wurde unter Stickstoff mit 5,7 n Salzsäure + 0,02%igem Mercaptoäthanol mindestens 21 Stunden lang bei 110°C hydrolysiert. Die Proben wurden auf den Aminosäureanalysator Unichrom (Beckmann-Instrument München), Empfindlichkeitsbereich 5 - 10 nMol, auf den LKB 3201 (LKB, München) mit einem Empfindlichkeitsbereich von 1 - 5 nMol oder auf den Durrum (D500), Empfindlichkeit 1 nMol, gegeben.

Bindung des Proteins S4 an 16S-rRNA

Die Bindungstests wurden nach der Methode von Daja-Grosjean et al. (1972) in einem molaren Verhältnis Protein:RNA von 3:1 und 5:1 durchgeführt.

Ergebnisse

A: Aminosäureveränderungen im Protein S12 der Mutanten

a) Escherichia coli L1-401

Die Aminosäurezusammensetzung des Proteins S12 der Streptomycin-resistenten Mutante L1-401 wurde untersucht. Nach Extraktion der ribosomalen Proteine der 30S-Untereinheit und nach Prüfung ihrer Reinheit mit der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese (Abb.1) wurden die Proteine durch CM-Cellulosechromatographie getrennt. Während S12 vom Wildtyp L1 zusammen mit S20 eluiert wird, erschien das S12-Protein der Mutante L1-401 viel früher im CM-Lauf, zusammen mit S13 (Abb.2). Die Trennung von S12 und S13 erfolgte durch Sephadex G100 mit 15%iger Essigsäure, die Reinheit des isolierten Proteins S12 wurde mit zweidimensionaler Gel-Elektrophorese geprüft. Abb.3 zeigt das Peptidmuster der tryptischen Peptide vom S12 der Mutante L1-401 nach Trennung durch Hochspannungspapierelektrophorese und anschließender Papierchromatographie (Fingerprint-Technik). Ein Vergleich mit dem Peptidmuster vom S12 des Wildtyps L1 (Abb.4) läßt ein neues Peptid neben Peptid T15 erkennen. T6 fehlt. Zusammensetzung des neuen Peptids: Asp₂, Thr₃, Ser₁, Pro₂, Ala₁, Val₁, Leu₁, Tyr₁, Lys₁, Arg₁. In der Sequenz von S12 folgt T19 auf T6 (Funatsu, unveröffentlicht). Zusammensetzung von T6: Thr₃, Pro₁, Val₁, Tyr₁, Lys₁; Zusammensetzung von T19: Asp₁, Ser₁, Pro₁, Ala₁, Leu₁, Lys₁, Arg₁. Das C-terminale Lysin des Peptids T6 ist durch Asparagin (oder Asparaginsäure) ersetzt, wodurch es zusammen mit T19 das neue tryptische Peptid



Abb.1. Elektrophoretische Auftrennung der 30S-Proteine der Mutante L1-401. Die Position der Proteine S12 und S4 stimmt mit der im Wildtyp L1 überein.

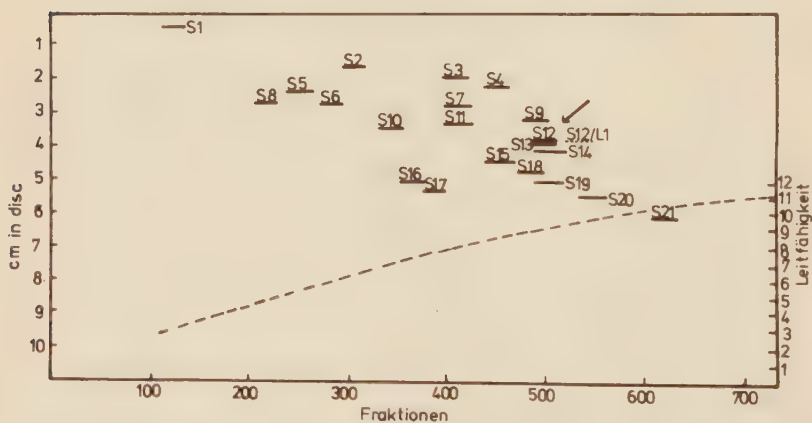


Abb.2. Trennung der ribosomalen 30S-Proteine der Mutante L1-401 mit CM-Cellulosechromatographie (Abszisse) und der Disc-Elektrophorese (Ordinate). Die gestrichelte Linie gibt die Position des Proteins S12 vom Wildtyp L1 wieder.

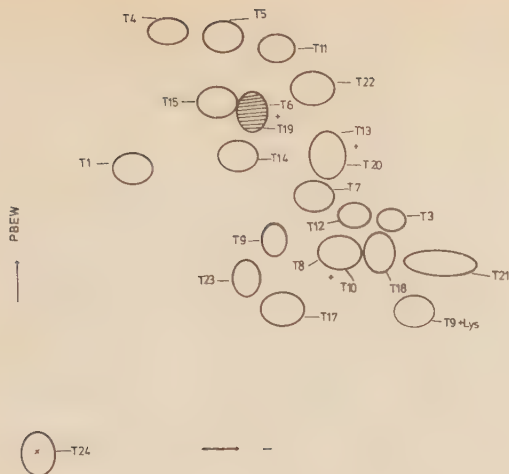


Abb.3. Fingerprint der tryptischen Peptide vom Protein S12 der Mutante L1-401.

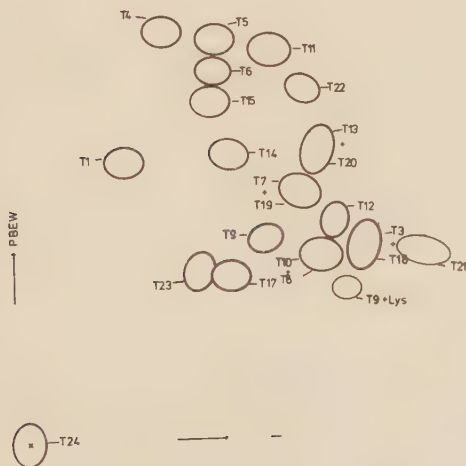


Abb.4. Fingerprint der tryptischen Peptide vom Protein S12 des Wildtyps L1.

bildet. T19 überlappt im Fingerprint der tryptischen Peptide von L1 das Peptid T7 (Aminosäurezusammensetzung aller tryptischen Peptide von S12 siehe Tabelle 1).

Ein Austausch von Lysin in Position 42 gegen Asparagin in Peptid T6 von S12 war schon einmal gefunden worden, nämlich bei der Streptomycin-resistenten Mutante SM-10 (Funatsu et al. 1972). Die str A1-Mutante L1-401 stimmt mit der SM-10-Mutante im Alleltyp überein. L1-401 stammt von *Escherichia coli* B ab, während SM-10 von *Escherichia coli* K abstammt. Derselbe Austausch im Protein S12 wurde also bei verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen gefunden.

b) *Escherichia coli* T776/40:4 und *Escherichia coli* T776/39:3

Da beide Mutanten Revertanten der Drug^D-Mutante L1-BP₄ und vom Genotyp str Ad sind, sollte bei beiden die gleiche Veränderung im S12-Protein vorliegen. Weder das Proteinmuster der 30S-Proteine nach Trennung durch zweidimensionale Gel-Elektrophorese noch das Proteinmuster der 30S-Proteine nach Trennung durch CM-Cellulosechromatographie und Disc-Elektrophorese zeigten eine Positionsänderung vom S12 der beiden Mutanten gegenüber dem Wildtyp S12. S12 wurde zusammen mit S20 von der CM-Cellulose eluiert. Die Trennung von S12 und S20 erfolgte auf Sephadex G100 mit 15%iger Essigsäure. Erst nach Trennung der tryptischen Peptide von S12 durch Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie wurde ein Unterschied im Peptidmuster sichtbar. Abb.5 zeigt, daß das Peptid T15 fehlt (Vgl. Abb.4). Das Peptid T15 hat die Zusammensetzung Gly₁, Pro₁, Val₂, Leu₁, Lys₁, Arg₁. Es er-

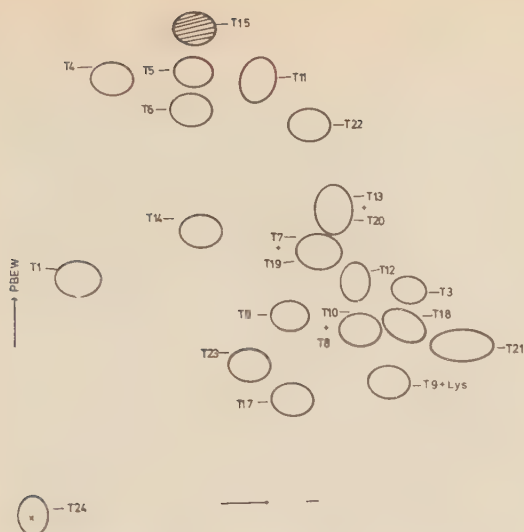


Abb.5. Fingerprint der tryptischen Peptide vom Protein S12 der Mutante T776/40:4 (vgl. Wildtyp L1 Abb.4).

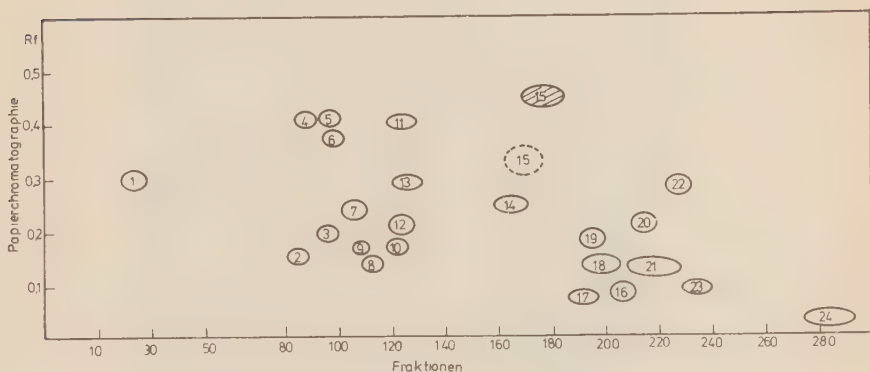


Abb.6. Trennung der tryptischen Peptide vom Protein S12 der Mutante T776/39:3 mit SE-Cellulosechromatographie (Abszisse) und Papierchromatographie (Ordinate), Peptid T15 schraffiert, Peptid T15 vom Protein S12 des Wildtyps L1 punktiert.

scheint ein neues Peptid oberhalb von T5. Das neue Peptid hat die Zusammensetzung Gly₁, Val₂, Leu₂, Lys₁, Arg₁. Es handelt sich um das Peptid T15, in dem die Aminosäure Prolin durch Leucin ersetzt ist. Dieser Aminosäureaustausch ist mit dem Nucleotidaustausch von Cytosin gegen Uracil im Codon für Prolin (CCC→CUC) erklärbar. Durch den Austausch von Prolin gegen Leucin wird auch die höhere Wanderungsgeschwindigkeit des neuen Peptids im PBEW-System verständlich. Die tryptischen Peptide der Mutante T776/39:3 wurden außerdem durch SE-Cellulose getrennt und papierchromatographisch gereinigt. Auch hier erscheint das veränderte T15-Peptid deutlich oberhalb der Position für das T15-Peptid des Wildtyps (Abb.6).

Die Sequenz vom Peptid T15 im S12-Protein des Wildtyps ist wahrscheinlich Val-Lys-Pro-Gly-Val-Leu-Arg (Funatsu, unveröffentlicht). Das Enzym Trypsin spaltet hinter Arginin und Lysin, außer wenn auf Lysin oder Arginin ein Prolin folgt. Obwohl in dem neuen Peptid T15 Prolin gegen Leucin ausgetauscht ist, entstehen nicht zwei tryptische Peptide. Eine Bindung Lys-Arg, die von Trypsin schwer gespalten wird, liegt nicht vor, denn Amino-peptidase spaltet am N-Terminus Valin und Lysin ab, Carboxypeptidase B am C-Terminus Arginin. Erfahrungsgemäß wird aber eine Bindung Lys-Leu, wie sie in dem veränderten Peptid T15 vorliegen muß, nur zu etwa 20% gespalten. Außerdem vermindert die Anhäufung von hydrophoben Aminosäuren in dem Peptid die Wirksamkeit von Trypsin.

c) Escherichia coli T779/25:3

Da T779/25:3 eine Revertante der Drug^D-Mutante L1-B₃₅re und



Abb.7. Fingerprint der tryptischen Peptide vom Protein J12 des Wildtyps L1 (oben) und der Mutante T179/25:3 (unten).

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide vom Protein S12 der Mutante T776/40:4 und der veränderten Peptide vom Protein S12 der Mutanten L1-401 und T779/25:3.
Dauer der Hydrolyse: 21 Stunden.

Peptide	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Cys
T1							1,00								1,00		
T2																	
T3																	
T4	1,00		1,23			2,23	1,05	0,74			0,71				0,79	1,00	
T5	1,10	1,07		1,33			1,00	2,23			1,02					0,60	
T6	2,90				1,03			1,45				0,82			1,00	0,60	
L1-401	1,83	2,82	0,75		2,20		0,77	1,28			1,09	0,65			1,25	1,00	
T7							0,74	1,00							0,74		
T8			0,86												1,00		
T9				1,20			0,93								1,00	1,07	
T10						2,30										0,85	
T11						1,83	1,50				0,75				1,00	0,71 (1)	
T12							1,00								0,87		
T13								0,71								1,00	
T14	1,17		1,15	2,16	1,75		1,60	1,10			0,95				1,00	0,81	0,45
L1				0,93	1,03		1,83				1,00				0,92	1,07	
T776/40:4					2,23						2,23				1,00	1,07	
T15					1,16										1,00	1,07	
T779/25:3					1,40		1,85				2,19				1,00	1,25	
T16				0,89			0,71								1,23	1,00	
T17	1,15														1,00	0,85	
T18							0,83	1,00							2,40		
T19	1,15	1,00		0,82			0,80			0,95					0,78	0,82	
T20		1,20			1,25		0,79				0,78				2,00		
T21				1,05												0,92	1,00
T22		1,05					1,15				1,25			1,20		1,00	
T23	1,00	0,87	1,22	1,28	1,78	1,70	1,92	1,76			0,89				1,33	1,31	1,11
T24	2,35	1,91	2,13	4,02		4,05	2,25			2,72	2,98 (1)	1,00	1,05		1,31		

ihr Genotyp str Ad ist, sollte ein verändertes S12-Protein vorliegen. Die Trennung der tryptischen Peptide mit der Fingerprint-Technik ergibt dasselbe Bild wie für das Protein S12 der Mutanten T776/40:4 und T776/39:3 (Abb.7). Auch hier fehlt das Peptid T15 und oberhalb von T6 erscheint ein neues Peptid mit der Aminosäurezusammensetzung Gly₁, Val₂, Leu₂, Lys₁, Arg₁. Im Peptid T15 ist Prolin gegen Leucin ausgetauscht.

Die beiden unabhängig voneinander isolierten, drogenabhängigen Mutanten L1-BP₄ und L1-B_{35re}, von denen die Revertanten T776/40:4, T776/39:3 und T779/25:4 abstammen, sind in der Aminosäureveränderung in Protein S12 der ribosomalen Untereinheit identisch. In beiden Mutanten ist in Position 88 des Proteins S12 ein Leucin anstelle des Prolins, das sich im Wildtyp an dieser Position befindet.

B: Aminosäureveränderungen im Protein S4 der Mutanten

a) Escherichia coli T776/40:4

Abb.8 gibt das Proteinmuster der 30S-Untereinheit der Revertante T776/40:4 nach Trennung durch zweidimensionale Gel-Elektrophorese wieder. Ein Vergleich mit Abb.1, auf der die Position vom Wildtyp S4 zu sehen ist, zeigt, daß das S4-Protein der Mutante nach rechts zur Kathode hin verschoben ist. Abb.9 zeigt die Trennung der 30S-Proteine mit CM-Cellulosechromatographie. Während S4 vom Wildtyp zusammen mit S15 eluiert wird, kam S4 der Mutante T776/40:4 etwas später aus der Säule. Da S4 durch CM-Cellulosechromatographie bereits genügend sauber war, brauchte es nicht über Sephadex gegeben zu werden. Die verzögerte Elution von S4 zeigt eine po-

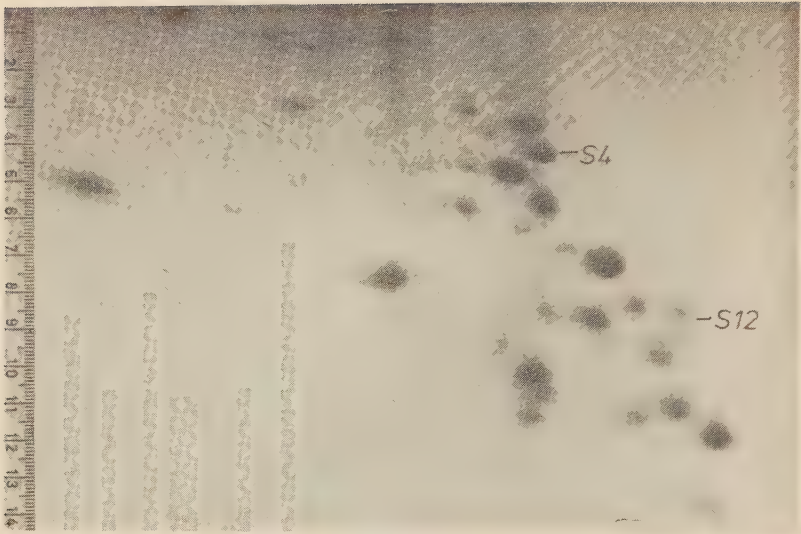


Abb.8. Elektrophoretische Auftrennung der 30S-Proteine der Mutante T776/40:4 (vgl. Abb.1).

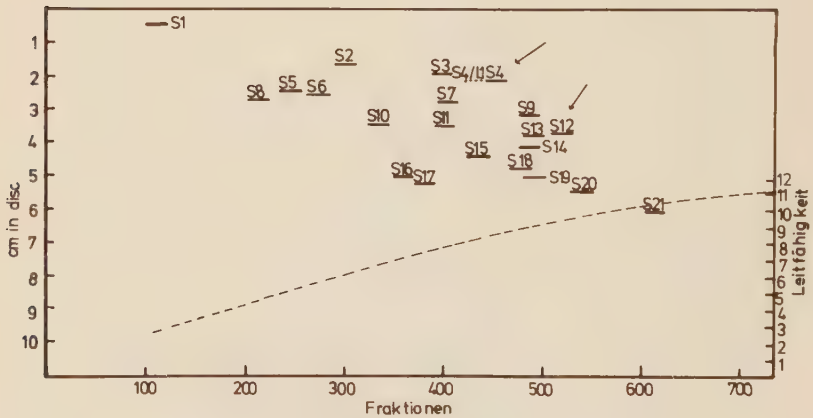


Abb.9. Trennung der ribosomalen 30S-Proteine der Mutante T776/40:4 mit CM-Cellulosechromatographie (Abszisse) und Disc-Elektrophorese (Ordinate). Die gestrichelte Linie gibt die Position des Proteins S4 vom Wildtyp L1 wieder.

sitivere Ladung an, was mit den Ergebnissen der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese übereinstimmt. SDS-Elektrophorese ergab keine signifikante Veränderung des Molekulargewichts (Abb.10, zum Vergleich das um etwa 20 Aminosäuren kürzere S4-Protein der Suppressormutante EBSu6). Allerdings liegen kleine Deletionen bis zu fünf Aminosäuren innerhalb der Fehlergrenze dieser Methode.

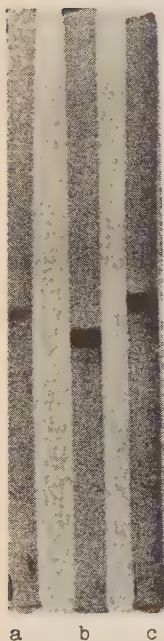


Abb.10
SDS-Elektrophorese vom Protein S4,
11 cm langes Gel

a T776/40:4
b EBSu6
c Wildtyp

Um festzustellen, in welchem Bereich des Proteins S4 die Veränderung, die zur Ladungsverschiebung führt, liegt, wurde mit Bromcyan gespalten. Bromcyan spaltet am Carboxylende von Methionin. Da Protein S4 nur 3 Methionine enthält, entstehen große Teilstücke. Die Position einiger großer, durch zweidi-

mensionale Gel-Elektrophorese getrennter Bromcyanpeptide ist auf der Abb.11 zu sehen (kleine Bromcyanpeptide laufen in der Pufferfront). Fleck Nr.1 besteht aus ungespaltenem S4-Protein, Fleck Nr.2 aus S4 ohne dem C-terminalen Bromcyanpeptid, das 28 Aminosäuren enthält und auf Abb.11 nicht zu sehen ist, weil es in der Pufferfront läuft. Fleck Nr.3 besteht aus den ersten beiden Bromcyanpeptiden vom N-Terminus bis zum zweiten Methionin der Proteinkette von S4 (Position 122), und Fleck Nr.4 besteht aus dem Bromcyanpeptid vom N-Terminus bis zum ersten Methionin in Position 103 (Reinbolt und Schiltz, 1973 und private Information zur Sequenz von S4 von E. Schiltz). Bei einem Vergleich mit den entsprechenden Peptiden des Wildtyp-S4-Proteins (Abb.12) sieht man, daß die Lage von 2, 3 und 4 unverändert ist. Nur das Gesamtprotein ist zur Kathode hin verschoben, und zwar um denselben Betrag wie S4 im Proteinmuster der 30S-Proteine (Abb.8). Daraus geht hervor, daß die Ladungsverschiebung auf einer Aminosäureveränderung im C-terminalen Bromcyanpeptid beruhen muß. Um festzustellen, ob die Veränderung nahe am C-Terminus liegt, wurde das Protein mit Carboxypeptidase A+B behandelt. Der C-Terminus von S4 des Wildtyps (tryptisches Peptid T32) hat die Sequenz: Ser-Asp-Leu-Ser-Ala-Asp-Ile-Asn-Glu-His-Leu-Ile-Val-Glu-Leu-Tyr-Ser-Lys (Reinbolt und Schiltz, 1973). Beim Protein S4 vom Wildtyp A19 spalten die Enzyme Carboxypeptidase A+B vier Aminosäuren vom C-Terminus her ab: Lysin, Serin, Tyrosin und Leucin (Funatsu et al. 1972). Bei der Mutante T776/40:4 wurden mit Carboxypeptidase A+B außer den genannten vier Aminosäuren nach viertelstündiger Einwirkung Valin und nach zweistündiger Einwirkung außerdem Isoleucin abgespalten. Es fehlt Glutaminsäure, die



Abb.11. Elektrophoretische Trennung der Bromcyanpeptide vom Protein S4 der Mutante T776/40:4.



Abb.12. Elektrophoretische Trennung der Bromcyanpeptide vom Protein S4 des Wildtyps L1.

5. Aminosäure vom C-Terminus her. Zur Kontrolle wurde S4-Protein vom Wildtyp L1, dem Ausgangsstamm der Mutante, mit Carboxypeptidase A+B behandelt. Wie beim Wildtyp A19 wurden die vier Aminosäuren Lysin, Serin, Tyrosin und Leucin abgespalten. 30 mg Protein S4 der Mutante T776/40:4 wurden mit Trypsin gespalten. Abb.13 zeigt das Peptidmuster der tryptischen Peptide nach Trennung mit SE-Cellulose und Reinigung durch Papierchromatographie. Lage und Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Peptide wurde zunächst mit den Ergebnissen für das Wildtyp-S4-Protein von *Escherichia coli* K (Wittmann-Liebold 1971) verglichen. Von Peptiden, in denen sich Abweichungen ergaben, wurden die entsprechenden Peptide des Wildtyps L1, dem Ausgangsstamm von T776/40:4, isoliert und analysiert, um auszuschließen, daß die Veränderung schon im L1 vorliegt, ohne daß eine Funktionsänderung durch sie zustandekommt. Nur zwei Peptide sind verändert: T7 und T32. T32 von L1 ist das C-terminale Peptid von S4 mit der oben genannten Sequenz. Die Löslichkeit von T32 des Wildtypproteins schwankt stark. Meist wird es mit 30% Pyridin/50% Ameisensäure als letztes tryptisches Peptid von der SE-Cellulose eluiert. T32 kann nur in Gesamthydrolysen gesammelter Fraktionen gefunden werden, da es papierchromatographisch nicht wandert. Bei der Mutante T776/40:4 wird T32 viel früher eluiert und wandert auf dem Chromatogramm (Abb.13). Deshalb konnte es rein gewonnen und analysiert werden. Bis auf eine Aminosäure stimmt seine Zusammensetzung mit der vom T32 im S4 des Wildtyps L1 überein. Ein Glutamin oder eine Glutaminsäure fehlt. Die Behandlung des isolierten Peptids T32 mit Carboxypepti-

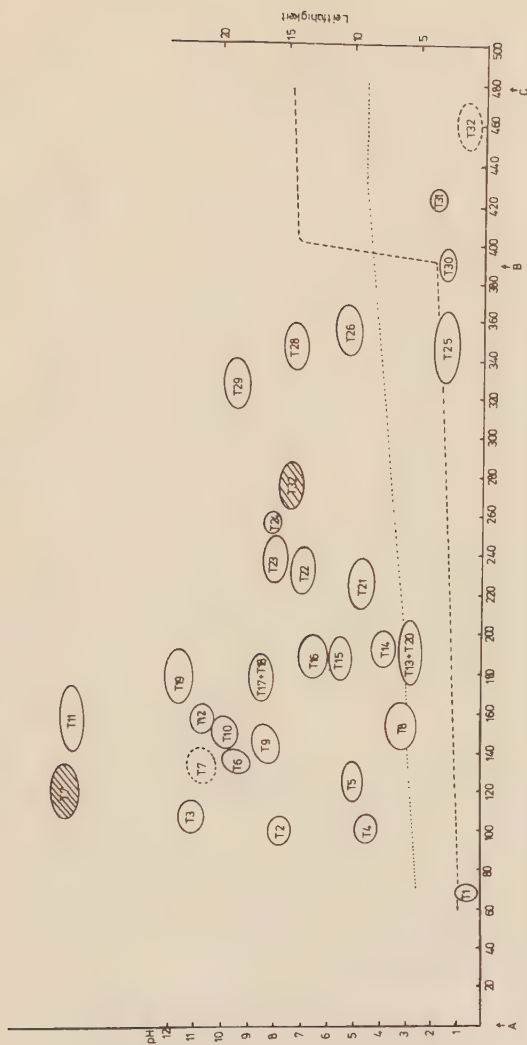


Abb.13. Trennung der tryptischen Peptide vom Protein S4 der Mutante T776/40:4 mit SE-Cellulosechromatographie (Abszisse) und Papierchromatographie (Ordinate).

A: 0,01 M Pyridin/Ameisensäure; Fraktion 20: Varigrad 0,01-0,32 M Pyridin/Ameisensäure; B: 50% Pyridin/30% Ameisensäure; C: 0,2 n Natriumhydroxyd.

Punktierter Linie: pH, gestrichelte Linie: Leitfähigkeit.

Peptid T32 und Peptid T7 vom Protein S4 der Mutante schraffiert, Peptid T32 und Peptid T7 vom Protein S4 des Wildtyps L1 punktiert.

dase A+B führte zum gleichen Ergebnis wie bei dem Gesamtprotein. Es fehlt Glutaminsäure, die 5. Aminosäure am C-Terminus. (Zusammensetzung aller Peptide siehe Tabelle 2).

Die zweite Veränderung im Protein T7 der Mutante T776/40:4 betrifft das tryptische Peptid T7. Dieses Peptid hat im Wildtyp die Aminosäurezusammensetzung Asp₁, Ser₁, Gln₁, Gly₁, Val₁, Leu₂, Tyr₁, Arg₁ und die Sequenz Leu-Ser-Asp-Tyr-Gly-Val-Glu-Leu-Arg (Reinbolt und Schiltz, 1973). Ein Peptid mit der genannten Aminosäurezusammensetzung war bei der Mutante T776/40:4 nicht zu finden. Statt dessen erschien ein neues tryptisches Peptid, das im PBEW-System schneller wanderte (Abb.13). Nach 21 Stunden Hydrolyse ergab sich bei diesem Peptid die Aminosäurezusammensetzung Asp₁, Ser₁, Gly₁, Val₁, Leu₂, Tyr₁, Arg₁. Die Aminosäure Glutamin in Position 53 fehlte. Die Werte für die Aminosäure Leucin waren nicht eindeutig. Sie schwankten zwischen 1,6 und 2,2. Um festzustellen, welche Aminosäuren sich am C-Terminus des Peptids befinden, wurde mit Carboxypeptidase A+B gespalten. Die Aminosäuren Arginin, Leucin und Valin wurden abgespalten. Dabei war nach einstündiger Einwirkung der Enzyme der Wert für Leucin doppelt so hoch wie der für Arginin, während der Wert für Valin deutlich unter dem von Arginin lag. Dieses Ergebnis legte den Schluß nahe, daß Glutamin im tryptischen Peptid T7 durch Leucin ersetzt ist, zumal Kontrollen am T7 des Wildtyps ein Arginin-Leucin-Verhältnis von 1:1 ergaben. Eine Bindung Leu-Leu wird schwer gespalten, so erhält man nach 21 Stunden Hydrolyse nicht den theoretischen Wert für Leucin. Es wurde deshalb 42 und 72 Stunden lang hydrolysiert.

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des Proteins S4, Mutante T776/40:4

Hydro-
lyse-
zeit

Peptide (h)	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Cys
T1 21	2,81		2,35	1,61	0,82		1,22	4,12		1,55		1,00					1,45
T2 21			3,41				3,00				2,40						1,00
T3 21	1,19	0,98		0,98		1,07					2,20		0,97		1,00		
T4 21																	1,00
T5 21	1,30	0,86					0,96			1,00					1,00		
T6 21	1,02				1,80	1,13	1,33	0,81	1,00								0,83
L1 T7 21	0,80		0,94	1,04	1,19		0,75				1,69	1,07					1,00
T7 21	1,16	0,90			1,46		1,20				1,61	1,15					1,00
T7 72	1,06	0,92			1,50		1,23				2,52	1,12					1,00
T8 21			1,25			2,00											1,00
T9 21		1,05		1,20	1,10			0,95					0,95		1,00		
T10 21	2,00						1,82				0,91	1,70					1,00
T11 21			1,23		1,35		0,74		1,00	1,19	0,96						1,04
T12 21		1,10			1,95	1,20		0,55				1,20					1,00
T13 21			2,51												2,00		
T14 21							1,22								1,00		
T15 21								1,32							1,00		
T16 21			1,49			1,25		0,50									1,00
T17 21			0,92								0,83						1,00
T18 21											0,78						1,00
T19 21					0,50	1,43					1,06	1,12			1,00		
T20 21			1,00	1,27													0,97
T21 21							0,97								1,00		
T22 21								0,74							1,00		
T23 21				1,40									0,95				1,00
T24 21	1,30											2,22					1,00
T25 21			2,80	0,85	1,85	1,98			1,00				0,92	1,40	1,19	0,71	
T26 21	0,90	1,16		2,00	0,90	1,13	1,00	0,94			0,88						1,65
T28 21			0,94	1,04				0,85			0,89		0,92		1,00		
T29 21	1,70	0,78		2,01		2,85	0,81				3,61				1,00	0,78	
T30 21					0,81										1,00	1,10	
T31 21				1,20	1,16										1,00		1,83
T32 21	3,11		2,55	0,84		1,46	1,23	1,23		1,63	2,20	0,85		0,97	1,00		

Verglichen mit Arginin stieg der Wert für Leucin von 1,6 (21 Stunden) auf 2,5 (72 Stunden) an. Dieser Anstieg beweist, daß tatsächlich ein Austausch von Glutamin gegen Leucin im Peptid T7 in Position 53 vorliegt, so daß ein Peptid mit der Sequenz Leu-Ser-Asp-Tyr-Gly-Val-Leu-Leu-Arg entsteht, in dem die Leu-Leu-Bindung nur unvollständig gespalten wird.

b) Escherichia coli T779/25:3

Auf Abb.14 sind die Proteine der 30S-Untereinheit dieser Mutante nach Auftrennung durch zweidimensionale Gel-Elektrophorese zu sehen. Die Position vom Protein S4 stimmt mit der vom Protein S4 des Wildtyps L1 überein (vgl. Abb.1).

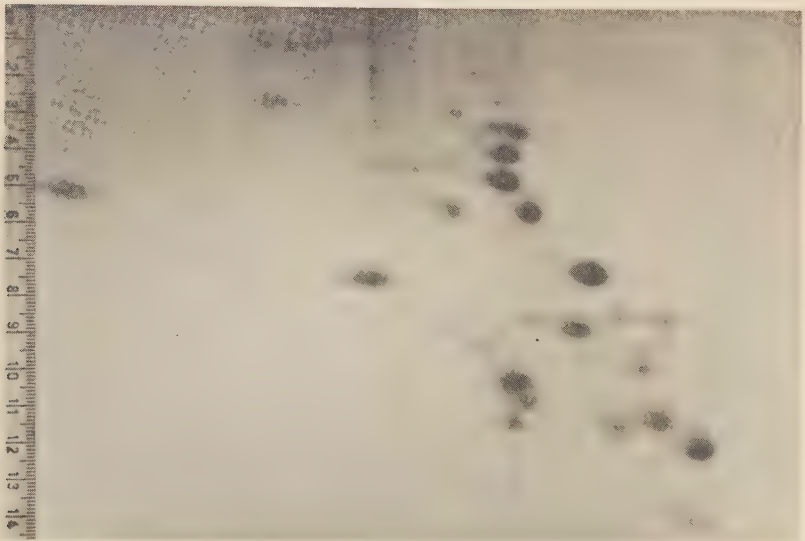


Abb.14. Elektrophoretische Auftrennung der 30S-Proteine der Mutante T779/25:3 (vgl. Abb.1)

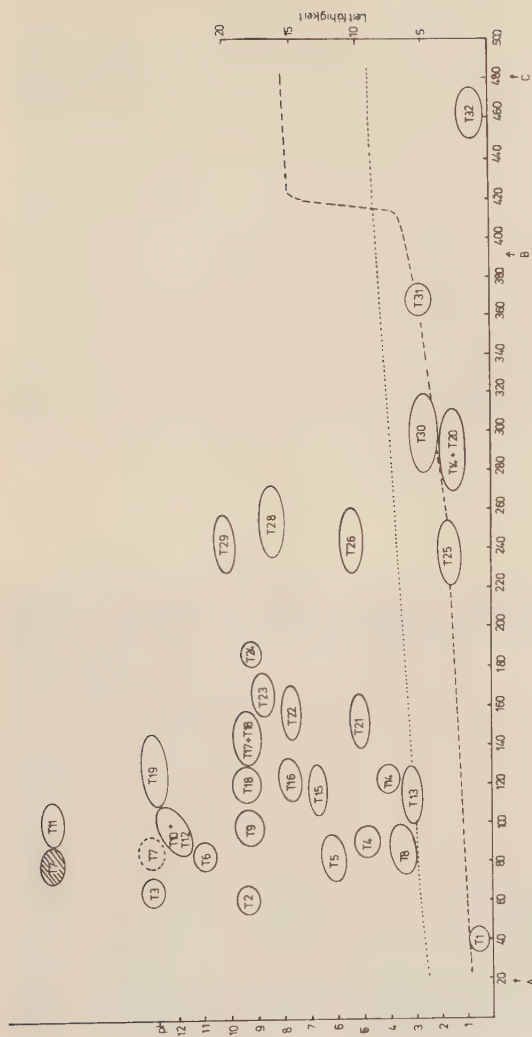


Abb. 15. Trennung der tryptischen Peptide vom Protein S 4 der Mutante T779/25:3 mit SE-Cellulosechromatographie (Abszisse) und Papierchromatographie (Ordinate).
Fraktion 1-20: 0,01 M Pyridin/Ameisensäure; A: Varigrad, 0,01-0,32 M Pyridin/Ameisensäure; B: 50% Pyridin/30% Ameisensäure; C: 0,2 n Natriumhydroxyd.

Punktierter Linie: pH, gestrichelte Linie: Leitfähigkeit.

Peptid T7 vom Protein S4 der Mutante schraffiert, Peptid T7 vom Protein S4 des Wildtyps L1 punktiert.

Wie beim Wildtyp L1 wurde das Protein S4 der Mutante T779/25:3 zusammen mit dem Protein S15 nach Trennung auf CM-Cellulose eluiert. Es mußte deshalb mit Sephadex G100 weiter gereinigt werden. Auch mit Carboxypeptidase A+B wurden dieselben Aminosäuren am C-Terminus von S4 abgespalten wie beim Wildtyp L1, nämlich Lysin, Serin, Tyrosin und Leucin.

Aminosäureanalysen sämtlicher tryptischer Peptide nach Trennung auf SE-Cellulose und Papierchromatographie ergaben einen Unterschied zum Wildtyp in nur einem Peptid, nämlich im T7 (Abb.15). Auch hier ist, wie schon beim S4-Protein der Mutante T776/40:4 das Glutamin in Position 53 durch Leucin ersetzt.

c) Escherichia coli T776/39:3

Obwohl die Abbildung der 30S-Proteine dieser Mutante nach Trennung mit zweidimensionaler Gel-Elektrophorese eine schwach veränderte Lage der Proteine S5, S4 und S3 zueinander zeigt (Abb.16), sind das Protein S4 und die Bromcyanpeptide auf Abb.17 deckungsgleich mit den entsprechenden Bromcyanpeptiden bzw. dem S4-Protein vom Wildtyp auf Abb.12. Möglicherweise ist aber eine schwache Positionsveränderung des Proteins nur dann zu erkennen, wenn mehrere Proteine auf der Gelplatte als Richtpunkte vorhanden sind. Die Trennung der 30S-Proteine durch CM-Cellulose und der tryptischen Peptide mit SE-Cellulose führt zum gleichen Ergebnis wie beim S4-Protein der Mutante T779/25:3: im Peptid T7 ist Glutamin durch Leucin ersetzt (Position 53).

Mit den hier angewandten Methoden ist eine Aminosäureverän-

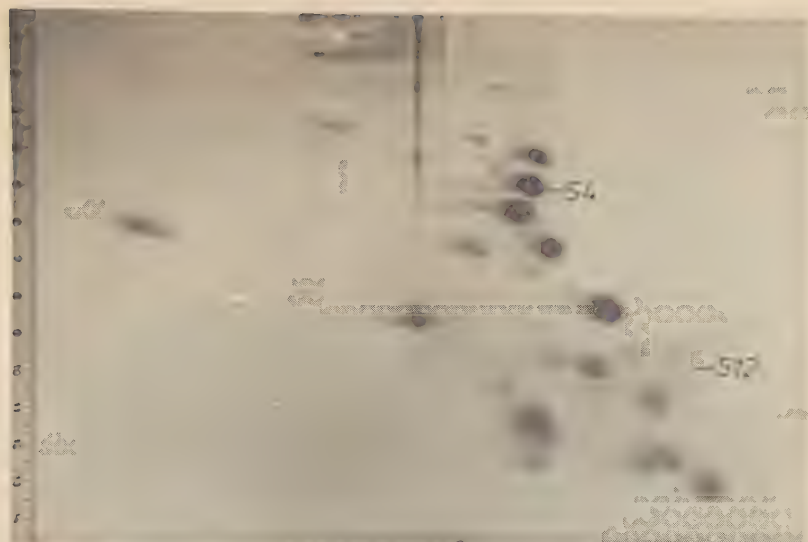


Abb.16. Elektrophoretische Auftrennung der 30S-Proteine der Mutante T776/39:3 (vgl. Abb.1).

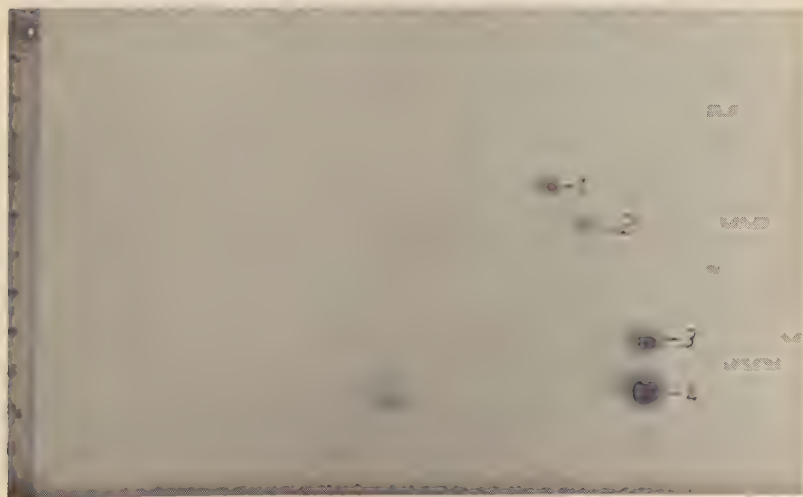


Abb.17. Elektrophoretische Trennung der Trypsinpeptide von Protein S4 der Mutante T776/39:3 (vgl. Abb.12).

Änderung von Asparaginsäure zu Asparagin oder von Glutaminsäure zu Glutamin (oder umgekehrt) anhand der Aminosäureanalysen nicht feststellbar. Ein solcher Austausch würde sich aber an der veränderten Position des entsprechenden Peptids auf dem Papierchromatogramm zeigen. Bei dem C-terminalen tryptischen Peptid T32 der Mutante T776/39:3 wäre allerdings auch das nicht sichtbar, denn das Peptid wandert nicht auf



Abb.18. Fingerprint der tryptischen Peptide vom Protein S4 der Mutante T776/39:3

dem Chromatogramm. Es wird nur in Gesamthydrolysen gesammelter Fraktionen nachgewiesen. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine zweite Aminosäureveränderung außer der in Peptid T7 vorhanden ist, ähnlich wie beim Protein S4 der Mutante T776/40:4.

Abb.18 zeigt die Position des veränderten Peptids T7 nach Auftrennung mit der Hochspannungselektrophorese und Papier-



Abb.19. Fingerprint der tryptischen Peptide vom Protein S4 des Wildtyps L1.

chromatographie. Für alle drei Mutanten ergibt sich das gleiche Bild: die Ladung von T7 ist unverändert. Das Peptid wandert jedoch schneller im Papierchromatogramm als das Peptid T7 vom Protein des Wildtyps und überlappt im Finger-print das Peptid T11 (vgl. L1, Abb.19).

Bindung des Proteins S4 an 16S-rRNA

Das ribosomale Protein S4 bindet direkt an 16S-rRNA (Mizushima & Nomura 1970, Schaup et al. 1970, 1971, Garrett et al. 1971, Zimmermann et al. 1972). Diese Bindung ist bei Mutanten mit großen Deletionen von 20 und 30 Aminosäuren am C-Terminus von S4 vermindert (Daya-Grosjean et al. 1972). Tabelle 1 gibt die Bindung vom S4-Protein der ram-Mutanten und des Wildtyps L1 an 16S-RNA wieder. Die Fehlergrenze bei diesem Test beträgt 20%. Bei keinem der drei Revertanten-Proteine weicht die Bindung signifikant von der des Wildtyp-Proteins ab.

Tab.3. Bindung von S4 aus Mutanten an 16S-RNA (in % der Bindung des Wildtyp-S4)

Molares Protein:RNA-Verhältnis

	3:1	5:1
Wildtyp	86%	100%
T776/36	78%	116%
T776/40	66%	81%
T779/25	65%	85%

Diskussion

A: Aminosäureveränderungen am Protein S12

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, können die von *Escherichia coli* L1-B abstammenden Streptomycin-Mutanten nach ihrem Phänotyp in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Alle Aminosäureveränderungen, die bisher bei Streptomycin-resistenten Mutanten gefunden wurden, lassen sich in nur zwei tryptischen Peptiden des Proteins S12 lokalisieren.

Die Aminosäurezusammensetzung des Proteins S12 von sieben Streptomycin-resistenten Mutanten ist untersucht worden (Funatsu und Wittmann, 1972). Drei Mutanten (SM-1, SM-5 und SM-10) stammen von *Escherichia coli* K-A19 ab; vier Mutanten (L44-1, L44-2, L44-4, L44-6) stammen von *Escherichia coli* B-L44 ab. L44-4 und SM-1 gehören zum Alleltyp str A40, mit einem Austausch von Lysin gegen Arginin im Peptid T15 von S12, Position 87. L44-6 und SM-5 gehören zum Alleltyp str A60 mit einem Austausch von Lysin gegen Arginin im Peptid T6, Position 42. Bei L44-1 und SM-10, Alleltyp str A1, ist Lysin durch Asparagin im Peptid T6 ersetzt, Position 42, und bei L44-2, Alleltyp str A2, ist Lysin durch Threonin im Peptid T6 ersetzt, Position 42. Die hier untersuchte Streptomycin-resistente Mutante L1-401 hat dieselbe Aminosäureveränderung wie L44-1 und SM-10, Alleltyp str A1, nämlich Lysin-Asparagin in Position 42.

Zwischen dem Lysin in Position 42 und dem Lysin in Position

87 liegen 45 Aminosäuren (Funatsu, unveröffentlicht), was 0,3 Rekombinationseinheiten im Strukturgen für S12 entspricht (Breckenridge & Gorini 1970).

Auch die beiden hier untersuchten Drug^D-Mutanten bilden einen Alleltyp. Bei beiden ist die Aminosäure Prolin durch Leucin im Peptid T15, Position 88, ersetzt. Dieses Ergebnis stimmt überein mit genetischen Befunden (Bjare & Gorini 1971). Fünf verschiedene Drug^D-Mutanten, unter ihnen die beiden hier beschriebenen L1-B_{35re} und L1-BP₄ vom Genotyp aro E24 ram⁺ spc⁺ str Ad wurden als Rezipienten in Transduktionsversuchen verwendet. Donorstämme waren genotypisch aro E⁺ ram¹ spc¹ str A1 und aro E⁺ ram⁺ spc³ str A1 (spc¹ und spc³ sind Alleltypen für Streptomycin-Resistenz). Am Arg-Phänotyp der Transduktanten war zu erkennen, daß es sich bei den Drug^D-Mutanten um eine homogene Klasse von Rezipienten handeln muß.

Die hier untersuchten Drug^D-Mutanten haben die Aminosäureveränderung im gleichen tryptischen Peptid (T15 in Position 88) wie die Sm^R-Mutante vom Alleltyp str A40 (T15, in Position 87). Bei einer Streptomycin-abhängigen Mutante ist im Peptid T6 in Position 42 Lysin gegen Glutamin ausgetauscht (Funatsu & Wittmann 1972) und bei zwei weiteren Streptomycin-abhängigen Mutanten liegt die Veränderung wiederum im Peptid T15 (Itoh & Wittmann 1973). Die bisher lokalisierten Aminosäureaustausche sind in Abb.20 zusammengefaßt.

Insgesamt läßt sich sagen, daß Punktmutationen im Strukturgen von Protein S12 sehr spezifisch Veränderungen des Phäno-

typs bewirken. Die vier Streptomycin-resistenten Alleltypen unterscheiden sich durch ihre Fähigkeit, eine phänotypische oder genetische Suppressorwirkung zu verringern. Es ergibt sich die Reihenfolge abnehmender Restriktion einer Suppressorwirkung: str A1, str A2, str A40, str A60, str A⁺ (Strigini & Gorini 1970). Einzelne Aminosäureveränderungen im Peptid T6 oder im Peptid T15 bewirken dieses phänotypisch unterschiedliche Verhalten. Bei den Alleltypen str A1, str A2 und str A60 liegen die Aminosäureveränderungen sogar in einem einzigen Codon, AAA, für Lysin.

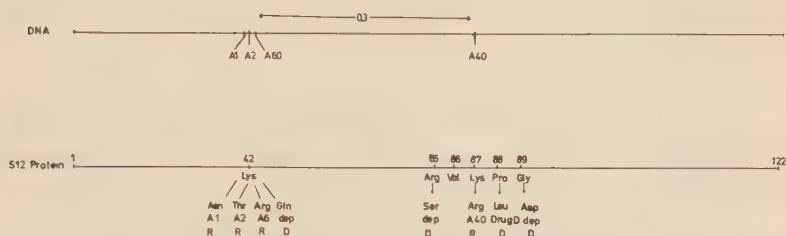


Abb.20. Position der Alleltypen für Streptomycin-Resistenz auf dem Strukturgen für S12 (oben); Position der bisher bekannten Aminosäureaustausche im Protein S12 (unten).

Betrachtet man Abb.20 und bringt man die genetischen und proteinchemischen Daten in einen Zusammenhang, so können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. In *Escherichia coli*-Mutanten mit verändertem Verhalten gegenüber Streptomycin sind nur zwei Regionen, nämlich um die Positionen 42 und 87, im ribosomalen Protein S12 betroffen.
2. Die Aminosäureaustausche im Protein S12 bei den Sm^R-

Mutanten stimmen mit der genetischen Feinstrukturanalyse (Breckenridge & Gorini 1970) überein. Zwischen den Alleltypen str A1, str A2, str A60 einerseits und dem Alleltyp str A40 andererseits liegen 0,3 Rekombinationseinheiten auf der Genkarte. Dem entsprechen 45 Aminosäuren zwischen Position 42 und Position 87 im Protein S12.

3. Transitionen im Codon für Lysin besitzen die Alleltypen str A40 und str A60 (AAA→AGA). Transversionen im Codon für Lysin haben die Alleltypen str A1 und str A2 (AAA→ACA und AAA→AAU). Das stimmt mit Voraussagen überein, die Breckenridge und Gorini (1970) auf Grund der verwendeten Mutagene gemacht hatten.
4. Sowohl Mutationen zu Sm-Resistenz als auch Mutationen zu Sm-Abhängigkeit sind auf beide Regionen im Protein S12 verteilt. Veränderungen, die zu Streptomycin-Resistenz führen, können sowohl im Peptid T6 als auch im Peptid T15 liegen. Das gleiche gilt für Streptomycin-Abhängigkeit. Die str A60-Mutante ähnelt im Phänotyp mehr der str A40- als der str A1-Mutante. Trotzdem liegen die Veränderungen für str A60 und str A1 in demselben Codon, während zwischen str A60 und dem weiter entfernten str A40-Allel Rekombination stattfinden kann. Im gleichen Codon wie die phänotypisch am schwächsten veränderte str A60-Mutation wurde auch die Streptomycin-abhängige Mutation lokalisiert mit dem Austausch von Lysin gegen Glutamin im Peptid T6 in Position 42, während die dem Drug^D-Allel im Strukturgen für S12 entsprechende Aminosäure in der Position 88 im Peptid T15 von S12 liegt.

5. Eine Gesetzmäßigkeit zwischen der Art des Aminosäureaustausches und der Art der Veränderung des Phänotyps läßt sich bisher nicht ableiten. Einerseits ist die Position des Austausches von Bedeutung; das ergibt sich daraus, daß ein Austausch von Lysin gegen Arginin in Position 42 (str A60-Alleltyp) zu einem anderen Phänotyp führt als der Austausch von Lysin gegen Arginin in Position 87 (str A40-Alleltyp). Andererseits ist die Art der Aminosäureveränderung von Bedeutung: denn ein Austausch von Lysin in Position 42 führt zu verschiedenen Phänotypen, je nachdem, ob Lysin durch Asparagin, Threonin, Arginin oder Glutamin ersetzt ist.

Innerhalb der 30S-Untereinheit des Ribosoms ist das Protein S12 möglicherweise so gefaltet, daß die tryptischen Peptide T6 und T15 auf Grund der Tertiärstruktur nebeneinanderliegen und eine Funktionseinheit bilden. Bei der Selektion unter Einwirkung von Streptomycin werden dann alle Mutationen erfaßt, die im Bereich dieser Funktionseinheit liegen. Dabei ergeben sich quantitative Unterschiede in der Ausprägung des Merkmals, für die die Art des Aminosäureaustausches innerhalb dieses Bereiches entscheidend ist.

B: Aminosäureveränderungen am Protein S4

Alle drei untersuchten Revertanten haben einen Austausch von Glutamin gegen Leucin in Position 53 im tryptischen Peptid T7. Dieser Aminosäureaustausch ist mit dem Nucleotidaustausch von Adenin gegen Uracil im Codon für Glutamin (CAG→CUG) erklärbar. Bei der Revertante T776/40:4 kommt eine Deletion

hinzu, die zur elektrophoretisch sichtbaren Veränderung des Proteins führt: am C-Terminus fehlt Glutaminsäure in Position 199. Es stellt sich die Frage, ob diese zweite Deletion funktionell von Bedeutung ist. Aus proteinchemischen und aus genetischen Untersuchungen geht nämlich hervor, daß dies wahrscheinlich nicht der Fall ist: a) Das S4-Protein des Wildtyps JC411 wurde mit Carboxypeptidase A+B behandelt. Auch hier fehlt Glutaminsäure am C-Terminus in Position 199, ohne daß damit eine Funktionsänderung verbunden wäre (Schiltz, unveröffentlicht. b) Bei der Mutante T779/25:3, bei der nur das Glutamin in Position 53 durch Leucin ersetzt ist, reicht diese Veränderung aus, um die Suppressorwirkung des Proteins S4 hervorzurufen. c) Schließlich geht aus Rekombinationsversuchen von Bjare & Gorini (1971) hervor, daß wie bei den S12-Mutanten jeweils viele unabhängig isolierte ram-Mutanten zum gleichen Alleltyp gehören. So wurden 18 Revertanten von 5 Drug^D-Mutanten als Donorstämme zur Transduktion genommen. Genotyp der Donorstämme ram spc1 str Ad (spc1 ist das Allel für Spectinomycin-Resistenz, hier verwendet als Marker, da spc zu 99% zusammen mit ram transduziert wird). Rezeptorstämme waren L1-431, Genotyp ram⁺ spc⁺ str A40 und L1, Genotyp ram⁺ spc⁺ str A⁺. Die Arg-Phänotypen, die sich aus den verschiedenen Kombinationen ergeben, zeigen wieder, daß es sich bei str Ad um einen einheitlichen Alleltyp handelt. Bei ram gibt es zwei Gruppen, die sich im Grad der Ambiguität unterscheiden. Zehn der 18 Revertanten bewirken einen höheren Grad an Ambiguität als die übrigen acht. Beide Gruppen sind in sich homogen und bilden vermutlich einen Alleltyp. Die drei ram-Mutanten T779/25:3, T776/39:3, T776/40:4 haben

den Aminosäureaustausch in Position 53. Sie gehören mit großer Wahrscheinlichkeit zum gleichen Alleltyp, da zusätzliche Veränderungen dicht am C-Terminus von S4 bei der Mutante T776/4084 für die Funktion bedeutungslos zu sein scheinen. Große Bedeutung für die ram-Funktion von S4 hat das Glutamin in Position 53.

Wenn man bedenkt, unter welchem starkem Selektionsdruck die ram-Mutanten isoliert werden, nämlich als Überlebende von drogenabhängigen Elternstämmen in einem Wachstumsmedium ohne Drogen, so erscheint es nicht verwunderlich, daß drei unabhängig isolierte ram-Mutanten dieselbe Aminosäureveränderung haben. Derselbe Aminosäureaustausch (sowohl in bezug auf die Art als auch auf die Position) wurde unabhängig von dem Elternstamm auch bei Streptomycin-resistenten Mutanten gefunden (Funatsu und Wittmann, 1972).

Bei mehreren Revertanten von Streptomycin-Abhängigkeit nach Streptomycin-Unabhängigkeit konnten größere Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung im Protein S4 festgestellt werden. Das zeigt sich an einer veränderten Position von S4 nach Auftrennung durch zweidimensionale Gel-Elektrophorese (Deusser et al. 1970, Hasenbank et al. 1973), der Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Elektrophorese und Behandlung des isolierten Proteins mit Carboxypeptidase (Funatsu et al. 1972). Am C-Terminus können bis zu dreißig Aminosäuren fehlen. Eine genaue Lokalisierung dieser Veränderung war bisher an einer Mutante möglich (Reinbolt & Schiltz 1973). Eine Deletion, die in Position 183 beginnt und 14 Nucleotide umfaßt, führt zu einer Rasterverschiebung und

zu anschließendem Kettenabbruch führt.

C: Bindung des Proteins S4 an 16S-rRNA

Das Protein S4 bindet direkt an 16S-rRNA. Diese Bindung ist vermindert bei Mutanten mit großen Deletionen im C-terminalen Bereich von S4. Sie ist nicht vermindert bei den ram-Mutanten, auch nicht bei der ram-Mutante T776/40:4, bei der Glutaminsäure am C-Terminus von S4 fehlt. Das Fehlen von Glutaminsäure in Position 199 ist daher sowohl für die RNA-Bindung als auch für die Suppressorwirkung des Proteins S4 bedeutungslos. Offensichtlich beeinflussen erst größere Veränderungen der C-terminalen Region beide Funktionen.

D: Die Bedeutung der Mutationen für die Funktion der Ribosomen

Die Proteine der ribosomalen Untereinheiten haben bestimmte Funktionen bei der Proteinbiosynthese (Pongs et al., 1974). Ribosomale Mutationen können Hinweise darauf geben, welcher Art diese Funktionen sind. Mutationen in ribosomalen Proteinen können zu Konformationsänderungen dieser Proteine und damit zu strukturellen Veränderungen innerhalb der ribosomalen Untereinheit führen. Bei Sm^{R} -Mutanten wirken sich Aminosäureveränderungen in den Positionen 42 und 87 im Protein S12 auf die Ablesegenauigkeit während der Translation aus. Aminosäuren, die bei Sm^{S} -Zellen durch irrtümliche Bindung (misreading) einer Aminoacyl-tRNA an das amber-Codon oder durch mutierte tRNA eingebaut wurden, sind in Sm^{R} -Zellen vom Einbau ausgeschlossen. In dieser Diskriminierung mancher

tRNAs zeigt sich die selektive Funktion der Ribosomen (Gorini 1971, Biswas & Gorini 1971). Ein Strukturbereich im Ribosom, der die Suppressorwirkung bestimmter tRNAs für die Argininsynthese in Sm^S -Zellen ermöglicht, muß in Sm^R -Zellen verändert sein. Bei den $Drug^D$ -Mutanten ist dieser Strukturbereich infolge des Aminosäureaustausches in Position 88 des Proteins S12 so verändert, daß die Bindung aller Aminoacyl-tRNAs gestört und so die Translation insgesamt verhindert wird. Die gleichen Faktoren - Zugabe von Streptomycin (in geringerem Maße von Paromomycin und Äthanol) oder Veränderungen in der Primärstruktur des ribosomalen Proteins S4 - bewirken Suppression sowohl bei den Sm^R - als auch bei den $Drug^D$ -Mutanten. Das weist darauf hin, daß die Strukturveränderungen in den Ribosomen grundsätzlich den gleichen Mechanismus, nur in unterschiedlichem Ausmaß, stören. Suppressormutationen für Streptomycin-abhängige Mutanten können außer im Strukturgen für das Protein S4 auch im Gen für das Protein S5 liegen. Dabei handelt es sich wie bei den ram-Mutanten um Punktmutationen (Itoh & Wittmann 1973).

Bei ribosomalen Mutationen werden immer wieder Veränderungen in bestimmten Regionen des veränderten Proteins, sogenannten hot spots, gefunden. Mehrere unabhängig voneinander isolierte Mutanten haben jeweils Veränderungen in der gleichen Region des betreffenden Proteins oder sogar denselben Aminosäureaustausch. Außer bei den Streptomycin- und ram-Mutanten zeigt sich das an Mutanten, die resistent gegen Spectinomycin oder Erythromycin sind. Spectinomycin-Resistenz wird durch Veränderungen im Strukturgen für das ribosomale

Protein S5 verursacht. Bei drei Spectinomycin-resistenten Mutanten liegt der Austausch in oder nahe dem tryptischen Peptid, T10, das aus nur drei Aminosäuren besteht (Funatsu et al. 1971, Funatsu et al. 1972, DeWilde und Wittmann-Liebold, 1973). In Erythromycin-resistenten Mutanten von *Escherichia coli* ist das ribosomale Protein L4 der 50S-Untereinheit verändert. Auch hier liegen die Aminosäureaustausche bei verschiedenen Mutanten vermutlich in demselben Peptid (Otaka et al. 1971).

Mutationen außerhalb der "hot spots" führen sehr wahrscheinlich zu Letalmutanten, weil die Struktur des betreffenden Proteins in einer Weise verändert ist, daß keine funktionstüchtigen Ribosomen entstehen können.

Zusammenfassung

Die Resistenz von *Escherichia coli*-Zellen gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin wird verursacht durch Mutationen im Strukturgen für das ribosomale Protein S12. Die hier untersuchte, von *Escherichia coli* B, L1 abstammende Streptomycin-resistente Mutante L1-401 hat dieselbe Aminosäureveränderung im Protein S12 wie SM10, eine von Funatsu et al. (1972) untersuchte, Streptomycin-resistente Mutante, die von *Escherichia coli* A19 abstammt. Beide Mutanten gehören mit einem Austausch von Lysin gegen Asparagin in Position 42 des Proteins S12 zum gleichen Alleltyp.

Auch bei den drogenabhängigen (Drug^D) Mutanten, die nur bei Zugabe von Streptomycin, Paromomycin oder Äthanol wachsen, liegt die Mutation im Strukturgen für das ribosomale Protein S12. Eine Suppressormutation, die ram-Mutation, im Strukturgen für das ribosomale Protein S4 führt zu Drogenunabhängigkeit. Bei drei ram-Mutanten, Revertanten zweier Drug^D -Mutanten, wurde die Aminosäurezusammensetzung der Proteine S12 und S4 mit der vom S12- und S4-Protein des Ausgangsstammes L1 verglichen. Die beiden Drug^D -Mutanten gehören zum gleichen Alleltyp. Bei ihnen ist in Position 88 von S12 Prolin gegen Leucin ausgetauscht. Auch in den drei S4-Proteinen der Revertanten liegt derselbe Aminosäureaustausch vor: in Position 53 des Proteins S4 ist Glutamin durch Leucin ersetzt. Eine zweite Mutation, die bei einer der ram-Mutanten auftritt und in einer Deletion von Glutaminsäure dicht am C-Terminus von S4 besteht, hat keine funk-

tionelle Bedeutung, da sie auch beim Protein S4 eines Wild-
typs gefunden wurde.

Mehrere unabhängig voneinander isolierte Mutanten haben
jeweils die gleiche Veränderung in der Primärstruktur der
ribosomalen Proteine S12 und S4. Das weist auf die Bedeu-
tung ganz bestimmter Aminosäuren für die Funktion dieser
Proteine hin.

Literatur

- Apirion, D., Schlessinger, D., Phillips, S., Sypherd, P.:
Escherichia coli: Reversion from streptomycin dependence, a mutation in a specific 30S ribosomal protein.
J. Mol. Biol. 43, 327 (1969)
- Birge, E. A., Kurland, C. G.: Reversion of a streptomycin-dependent Escherichia coli.
Science 166, 1282 (1969)
- Birge, E. A., Kurland, C. G.: Reversion of a streptomycin-dependent strain of Escherichia coli.
Molec. Gen. Genetics 109, 356 (1970)
- Biswas, D., Gorini, L.: Restriction, de-restriction and mis-translation in missense suppression.
J. Mol. Biol. 64, 119 (1972)
- Bjare, U., Gorini, L.: Drug dependence reversed by a ribosomal ambiguity mutation, ram, in Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 57, 423 (1971)
- Breckenridge, L., Gorini, L.: Genetic analysis of streptomycin resistance in Escherichia coli.
Genetics 65, 9 (1970)
- Cox, E. C., White, J. R., Flaks, J. G.: Streptomycin action and the ribosome.
Biochemistry 51, 703 (1964)
- Craven, G. R., Voynow, P., Hardy, S. J. S., Kurland, C. G.:
The ribosomal proteins of Escherichia coli. II. Chemical and physical characterization of the 30S ribosomal proteins.
Biochemistry 8, 2906 (1969)

- Davies, J. E.: Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant strains of *Escherichia coli*.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 659 (1964)
- Davies, J., Gorini, L., Davis, B. D.: Misreading of RNA code-words induced by aminoglycoside antibiotics.
Mol. Pharmacol. 1, 93 (1965)
- Davies, J., Jones, D. S., Khorana, H. G.: A further study of misreading of codons induced by streptomycin and neomycin using ribonucleotides containing two nucleotides in alternating sequence as templates.
J. Mol. Biol. 18, 48 (1966)
- Daya-Grosjean, L., Garrett, R. A., Pongs, O., Stöffler, G., Wittmann, H. G.: Properties of the interaction of ribosomal protein S4 and 16S RNA in *Escherichia coli*.
Molec. Gen. Genetics 119, 277 (1972)
- Deusser, E., Stöffler, G., Wittmann, H. G., Apirion, D.: Ribosomal proteins XVI. Altered S4 proteins in *Escherichia coli* revertants from streptomycin dependence to independence.
Molec. Gen. Genetics 109, 298 (1970)
- Dzionara, M., Kaltschmidt, E., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XIII. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of *Escherichia coli*.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 67, 1909 (1970)
- Funatsu, G., Schiltz, E., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XXVII. Localization of the amino acid exchanges in protein S5 from two *Escherichia coli* mutants resistant to spectinomycin.
Molec. Gen. Genetics 114, 106 (1971)

- Funatsu, G., Nierhaus, K., Wittmann-Liebold, B.: Ribosomal proteins XXII. Studies on the altered protein S5 from a spectinomycin-resistant mutant of *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. 64, 201 (1972)
- Funatsu, G., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XXXIII. Location of amino-acid replacements in protein S12 isolated from *Escherichia coli* mutants resistant to streptomycin.
J. Mol. Biol. 68, 547 (1972)
- Funatsu, G., Nierhaus, K., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XXXVII. Determination of allele types and amino acid exchanges in protein S12 of three streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*.
Biochim. Biophys. Acta 287, 282 (1972a)
- Funatsu, G., Puls, W., Schiltz, E., Reinbolt, J., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XXXI. Comparative studies on altered proteins S4 of six *Escherichia coli* revertants from streptomycin dependence.
Molec. Gen. Genetics 115, 131 (1972b)
- Garrett, R. A., Rak, K. H., Daya, L., Stöffler, G.: Ribosomal proteins XXIV. Specific protein binding sites of 16S RNA of *E. coli*.
Molec. Gen. Genetics 114, 112 (1971)
- Gorini, L., Gundersen, W., Burger, M.: Genetics of regulation of enzyme synthesis in the arginine biosynthetic pathway of *E. coli*.
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 173 (1961)
- Gorini, L., Kataja, E.: Phenotypic repair by streptomycin of defective genotypes in *E. coli*.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 487 (1964)

- Gorini, L.: Induction of code ambiguity by aminoglycoside antibiotics.
Fed. Proc. 26, 5 (1967)
- Gorini, L., Rosset, R., Zimmermann, R. A.: Phenotypic masking and streptomycin dependence.
Science 157, 1314 (1967)
- Gorini, L.: The contrasting role of str A and ram gene products in ribosomal functioning.
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 101 (1969)
- Gorini, L.: Ribosomal discrimination of tRNAs.
Nature New Biology 234, 261 (1971)
- Hardy, S. J. S., Kurland, C. G., Voynow, P., Mora, G.: The ribosomal proteins of *Escherichia coli*. I. Purification of the 30S ribosomal proteins.
Biochemistry 8, 2897 (1969)
- Hasenbank, R., Guthrie, C., Stöffler, G., Wittmann, H. G., Rosen, L., Apirion, D.: Electrophoretic and immunological studies on ribosomal proteins of 100 *Escherichia coli* revertants from streptomycin dependence.
Molec. Gen. Genetics 127, 1 (1973)
- Hindennach, I., Stöffler, G., Wittmann, H. G.: Isolation of the proteins from 30S ribosomal subunits of *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. 23, 7 (1971a)
- Hindennach, I., Kaltschmidt, E., Wittmann, H. G.: Isolation of proteins from 50S ribosomal subunits of *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. 23, 12 (1971b)

- Hashimoto, K.: Streptomycin resistance in *Escherichia coli* analyzed by transduction.
Genetics 45, 49 (1960)
- Itch, T., Wittmann, H. G.: Amino acid replacements in proteins S5 and S12 of two *Escherichia coli* revertants.
Molec. Gen. Genetics 127, 19 (1973)
- Jacoby, G. A., Gorini, L.: A unitary account of the repression mechanism of arginine biosynthesis in *E. coli*.
J. Mol. Biol. 39, 73 (1969)
- Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Donner, D., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins I. Isolation, amino acid composition, molecular weights and peptide mapping from *Escherichia coli* ribosomes.
Molec. Gen. Genetics 100, 364 (1967)
- Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XV. Amino acid compositions of isolated ribosomal proteins from 30S and 50S subunits of *Escherichia coli*.
Molec. Gen. Genetics 109, 292 (1970)
- Kaltschmidt, E., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacryamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins.
Anal. Biochem. 36, 401 (1970a)
- Kaltschmidt, E., Wittmann, H. G.: Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 67, 1276 (1970b)
- Kreider, G., Brownstein, B. L.: A mutation suppressing streptomycin dependence.
J. Mol. Biol. 61, 135 (1971)

- Mizushima, S., Nomura, M.: Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*.
Nature 226, 1214 (1970)
- Momose, H., Gorini, L.: Genetic analysis of streptomycin dependence in *Escherichia coli*.
Genetics 67, 19 (1971)
- Moore, P. B., Traut, R. R., Noller, M., Pearson, P., Delius, H.: Ribosomal proteins of *Escherichia coli* II. Proteins from the 30S subunit.
J. Mol. Biol. 31, 441 (1968)
- Mora, G., Donner, D., Thammana, P., Lutter, L., Kurland, C. G., Craven, G. R.: Purification and characterization of 50S ribosomal proteins of *Escherichia coli*.
Molec. Gen. Genetics 112, 229 (1971)
- Otaka, E., Itoh, T., Osawa, S.: Peptide analysis of a protein component, 50-8, of 50S ribosomal subunit erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* and *Escherichia freundii*.
Molec. Gen. Genetics 114, 14 (1971)
- Ozaki, M., Mizushima, S., Nomura, M.: Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E. coli*.
Nature 222, 333 (1969)
- Pittard, J., Wallace, B. J.: Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *E. coli*.
J. Bact. 91, 1494 (1966)
- Pongs, O., Nierhaus, K. H., Erdmann, V. A., Wittmann, H. G.: Active sites in *Escherichia coli* ribosomes.
FEBS Letters, in press (1974)

- Reinbolt, J., Schiltz, E.: The primary structure of ribosomal protein S4 from *Escherichia coli*.
FEBS Letters 36, 250 (1973)
- Rosset, R., Gorini, L.: A ribosomal ambiguity mutation.
J. Mol. Biol. 39, 95 (1969)
- Schaup, H. W., Green, M., Kurland, C. G.: Molecular interactions of ribosomal components. I. Identification of RNA binding sites for individual 30S ribosomal proteins.
Molec. Gen. Genetics 109, 193 (1970)
- Strigini, P., Gorini, L.: Ribosomal mutations affecting efficiency of amber suppression.
J. Mol. Biol. 47, 517 (1970)
- Strigini, P., Brickmann, E.: Analysis of specific misreading in *E. coli*.
J. Mol. Biol. 75, 659 (1973)
- Traut, R. A., Moore, P. R., Delius, H., Noller, H., Tissières, A.: Ribosomal proteins of *Escherichia coli*. Demonstration of different primary structures.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 1294 (1967)
- Traut, R. A., Delius, H., Ahmed-Zadeh, C., Bickle, T. A., Pearson, P., Tissières, A.: Ribosomal proteins of *Escherichia coli*: stoichiometry and implication for ribosome structure.
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 34, 25 (1969)
- Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chemistry 144, 4406 (1969)

- DeWilde, M., Wittmann-Liebold, B.: Localization of the amino-acid Exchange in protein S5 from an *Escherichia coli* mutant resistant to spectinomycin.
Molec. Gen. Genetics 127, 273 (1973)
- Wittmann-Liebold, B.: Ribosomal proteins XXI. Amino acid composition of the tryptic peptides isolated from proteins S4, S18 and S20 of *Escherichia coli* ribosomes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 352, 1705 (1971)
- Zimmermann, R. A., Garvin, R. T., Gorini, L.: Alternation of a 30S ribosomal protein accompanying the ram mutation in *Escherichia coli*.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68, 2263 (1971)
- Zimmermann, R. A., Muto, A., Fellner, P., Ehresmann, C., Branlant, C.: Localisation of ribosomal protein binding sites on 16S ribosomal RNA.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 1282 (1972)

Abkürzungen

Arg ^{CSD}	Streptomycin-abhängig bei Abwesenheit von Arginin
Aro	Eine Anzahl von Wachstumsfaktoren, die von aro E-Mutanten benötigt werden
CSD	conditionally streptomycin dependent
Drug ^D	Drogenabhängigkeit
Et ^D	Äthanol-dependent
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
Pm ^D	Paromomycin-dependent
ram	ribosomal ambiguity mutation, ram-Allel
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
Sm ^D	Streptomycin-dependent
Sm ^R	Streptomycin-resistent
Sm ^S	Streptomycin-sensibel
spc	Spectonomycin
str A ⁺	Wildallel für das Streptomycin-Gen
str Ad	Allel für Drogenabhängigkeit
str A1	Alleltypen für Streptomycin-Resistenz
str A2	
str A40	
str A60	
su	Suppressor
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
30S	30S-Untereinheit
50S	50S-Untereinheit
70S	70S-Untereinheit

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. H. G. Wittmann durchgeführt.

Herrn Dr. E. Schiltz danke ich für wertvolle Hinweise in peptidchemischen Fragen und Frau E. Marzinzig für die sorgfältige Anfertigung der Zeichnungen und Fotografien.

Lebenslauf

Am 24.6.1939 wurde ich, Ute van Acken, als Tochter des kaufmännischen Angestellten Walter van Acken und seiner Ehefrau Gertrud in Duisburg geboren. In Dresden besuchte ich acht Jahre lang die Grundschule und zwei Jahre die Oberschule. Nach Duisburg zurückgekehrt, erlernte ich den Beruf Gärtner und war danach eine Zeitlang als Gärtnergehilfe tätig. Hierauf besuchte ich das Institut zur Erlangung der Hochschulreife in Köln, wo ich 1964 die Reifeprüfung ablegte. Daran schlossen sich zwei Semester Studium der Botanik an der Universität Köln an, ein Semester Gartenbau an der Technischen Hochschule München und sieben Semester Gartenbau an der Technischen Hochschule Berlin. Die Diplomhauptprüfung legte ich 1969 ab. Von 1970 bis 1971 war ich wissenschaftlicher Mitarbeiter am Hygiene-Institut der Universität Frankfurt/Main. Seit September 1971 bin ich am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in der Abteilung von Prof. Dr. Wittmann als Doktorandin tätig.

